

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai September 2014 di *Green House* dan Laboratorium Genetika dan Molekuler jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: plastik untuk sampel, polibag, *erlenmeyer*, corong, kertas saring, mortar, *sentrifuge*, tube (2.5 ml, 1,5 ml), mikropipet (0,5-10  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l, 2-40  $\mu$ l, 0,5-2,5  $\mu$ l), satu set elektroforesis vertikal, sisir, oven, *autoclave*, rak tabung, kaca pencetak gel, timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass*, tip, nampan atau cawan untuk pencucian gel, *freezer*, almari es, vorteks, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spektrofotometer.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kedelai tahan CPMMV varietas Tanggamus dan Wilis, dan kedelai rentan CPMMV varietas Anjasmoro dan Argomulyo, fosfat buffer, carborundum, buffer ekstrak, PMSF, DTT (*Dithiotreitol*), aquabides, T-acrylamid 30 %, Tris-HCl, SDS, APS, TEMED, RSB, Marker protein, Running Buffer, larutan staining, dan larutan destaining.

### **3.3 Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1. Penanaman kedelai**

Biji kedelai yang digunakan dalam penelitian ini adalah varietas Tanggamus dan Wilis yang tahan CPMMV, varietas Anjasmoro dan Argomulyo yang rentan CPMMV. Penanaman kedelai dilakukan dengan menanam biji tanaman kedelai pada polibag.

#### **3.3.2 Inokulasi mekanik**

Tanaman yang digunakan untuk memperbanyak sumber inokulum virus adalah kedelai terinfeksi virus yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (BALITKABI).

Daun kedelai terinfeksi virus digerus dalam mortar steril, dan ditambahkan dengan fosfat buffer pH 7 (1:9 w/v). Kemudian daun yang sudah hancur disaring dengan menggunakan kasa steril. Substrat yang diperoleh segera digunakan untuk inokulasi ke tanaman (Barmawi, 2007)

Setiap tanaman diinokulasi 0,125 ml CPMMV pada setiap daun termuda yang telah membuka penuh (7 hari setelah tanam) pada masing-masing varietas dan satu dari masing-masing varietas yang tidak diinokulasi (kontrol). Sebelum inokulasi daun diberi karborundum 600 mesh pada bagian permukaan atas, kemudian substrat yang diperoleh dioleskan dengan telunjuk jari tangan pada permukaan daun, yang dimulai dari daun bagian bawah didekat pertulangan daun ke bagian atas secara searah dengan tidak mengulangi pada daerah yang sama. Segera setelah pengolesan substrat dilakukan

pembilasan sisa-sisa yang masih melekat pada permukaan daun tanaman uji menggunakan air mengalir. Pengamatan dan pengambilan sampel kedelai terinfeksi CPMMV dilakukan setelah 10 hari setelah inokulasi (Saleh, 2009).

### 3.3.3 Isolasi protein

Isolasi protein total dari daun tanaman kedelai sehat dan terinfeksi dilakukan menurut Stacy dan Aalen (2003) dengan cara:

1. Ditimbang daun kedelai 0,1 gram
2. Ditambahkan nitrogen cair dan digerus dalam mortar
3. Ditambahkan 500  $\mu$ l buffer ekstrak
4. Dimasukkan ke tabung eppendorf yang sebelumnya telah diisi 250  $\mu$ l buffer ekstrak
5. Ditambahkan 26  $\mu$ l PMSF 40 mM kemudian di vorteks
6. Di inkubasi 1 jam didalam refrigator, di vorteks setiap 15 menit sekali
7. Disentrifugasi 13.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit
8. Supernatan di pindah ke dalam eppendorf baru (supernatan 1)
9. Pellet ditambahkan 250  $\mu$ l buffer ekstrak kemudian di vorteks
10. Ditambahkan 13  $\mu$ l PMSF 40 mM kemudian di vortex
11. Diinkubasi 1 jam didalam refrigator, di vorteks setiap 15 menit sekali
12. Disentrifugasi 13.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit
13. Dibuang pellet dan supernatan disimpan ditambahkan dengan supernatan 1

### 3.3.4. Penentuan Konsentrasi Protein

Penentuan konsentrasi protein terlarut kedelai dilakukan dengan metode biuret, (AOAC, 1995):

#### 3.3.4.1 Pengukuran panjang maksimum BSA (*Bovine serum Albumin*) 400 ppm

1. Dibuat larutan stok BSA 4000 ppm (4 mg/1 ml) sehingga dibuat 12 mg/3 ml NaCl 0.9 %
2. Diambil 400  $\mu$ l stok BSA ditambahkan 800  $\mu$ l biuret
3. Divortex dan didiamkan selama 30 menit pada suhu 37  $^{\circ}$ C
4. Dibaca absorbansi pada  $\lambda$  540-560 nm

#### 3.3.4.2 Pengukuran dan Pembuatan kurva standart BSA

1. Diencerkan larutan stok BSA menjadi konsentrasi 400, 800, 1200, 1600, 2000, 2400, 2800, 3200, 3600 ppm. Pengenceran dilakukan dengan mengencerkan larutan BSA stock dan NaCl 0,9 %
2. Diambil 400  $\mu$ l stok BSA hasil pengenceran dan ditambahkan 800  $\mu$ l biuret
3. Divortex, didiamkan selama 30 menit pada suhu 37  $^{\circ}$ C
4. Dibaca absorbansi pada  $\lambda$  maksimum
5. Dibuat persamaan regresi linier

#### 3.3.4.3 Pengukuran protein terlarut sampel

1. Diambil 50 $\mu$ l protein sampel dilarutkan dalam 350  $\mu$ l NaCl 0,9 % kemudian ditambahkan 800  $\mu$ l biuret
2. Divortex, didiamkan selama 30 menit pada suhu 37  $^{\circ}$ C
3. Dibaca absorbansi pada  $\lambda$  maksimum

4. Dimasukkan dalam persamaan regresi linier

### 3.3.5 Elektroforesis SDS PAGE

Penentuan berat molekul (BM) protein dilakukan melalui metode SDS-PAGE. Urutan metode tersebut adalah sebagai berikut. *Separating gel* 12 % (ddH<sub>2</sub>O 1700 µl, T-acrylamide 30 % 2000 µl, LGB 1300 µl, APS 70 µl, TEMED 7 µl) dimasukkan ke dalam pasangan plat kaca dan ditunggu beberapa saat sampai gel terpolarisasi. Stacking gel 3 % (ddH<sub>2</sub>O 812 µl, T-acrylamide 30 % 220 µl, LGB 344 µl, APS 8,25 µl, TEMED 5,5 µl) dimasukkan di atas *seperating gel* dan dipasang sisir untuk membuat sumuran tempat memasukkan sampel protein. Setelah stacking gel berpolarisasi, gel dilepas dari cetaknya dan plat dirangkai dengan apparatus elektroforesis berisi running buffer.

Dipanaskan sampel + RSB (1:1) dalam oven 95 °C selama 3 menit. Sedangkan marker + RSB (1:20) , didinginkan sampel+RSB dan marker + RSB, kemudian dimasukkan 15 µl sampel + RSB kedalam setiap *well*, untuk marker 5 µl/*well*. Elektroforesis pada 100 volt 40 mA dilakukan selama +/- 80 menit. Pewarnaan (*staining*) pita protein dilakukan dengan jalan merendam gel hasil elektroforesis (setelah dilepas dari rangkaian plat) dalam larutan coomasie brilliant blue selama 30 menit dengan digoyang-goyang. Setelah diwarnai, dilakukan *destaining* untuk menghilangkan kelebihan warna dengan jalan merendam gel dalam larutan *destaining* selama 24 jam.

### **3.3.6. Profil Protein**

Analisis berat molekul (BM) masing-masing protein hasil isolasi daun tanaman kedelai dilakukan dengan menggunakan program aplikasi Image lab<sup>TM</sup> software versi 5.1 dengan menggunakan protein marker sebagai standart. Hasil scanning pita-pita protein dipetakan ke dalam kurva persamaan regresi linier sehingga didapatkan nilai BM protein pada masing-masing sampel.

### **3.3. 7 Analisis Data**

Data berupa berat molekul pita-pita protein kedelai dianalisis secara deskriptif kualitatif. Analisis deskriptif dilakukan dengan membandingkan pita protein yang muncul pada varietas kedelai tahan CPMMV dengan varietas kedelai rentan CPMMV dan juga dengan kedelai normal (kontrol).